



烟草化感自毒物质降解复合菌剂的优化及应用效果评价

杨文娟¹, 余君², 杨春雷², 李浩², 杨锦鹏², 杨小琼¹, 杨勇¹, 向海波^{1*}

1 湖北大学生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 湖北省烟草科学研究院, 湖北 武汉 430030

杨文娟, 余君, 杨春雷, 李浩, 杨锦鹏, 杨小琼, 杨勇, 向海波. 烟草化感自毒物质降解复合菌剂的优化及应用效果评价[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1044-1063.

YANG Wenjuan, YU Jun, YANG Chunlei, LI Hao, YANG Jinpeng, YANG Xiaoqiong, YANG Yong, XIANG Haibo. Optimization and evaluation of a compound bacterial agent degrading autotoxins of tobacco[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1044-1063.

摘要: 烟草(*Nicotiana tabacum*)长期连作导致土壤中烟草自身分泌的化感自毒物质的积累, 加剧了烟草青枯病(tobacco bacterial wilt, TBW)的发生, 严重威胁烟草的生产并造成了巨大的经济损失。【目的】获得对长期连作烟田青枯病具有显著防治效果的复合菌剂。【方法】利用筛选到的烟草化感自毒物质降解菌株构建复合菌剂, 通过正交试验和单因素试验对菌种配比和助剂进行优化, 对其在温室盆栽和连作烟田生产的应用效果进行评价。【结果】正交试验结果表明, 复合菌剂中芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) NO1、布鲁氏菌(*Brucella* sp.) NO8、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) NO9 和 NO10 的最佳菌种配比为 1:3:4:2; 单因素试验结果表明最佳的载体为白炭黑; 最佳润湿剂和分散剂分别为六偏磷酸钠和丁基茶磺酸钠, 其最佳比例为 1:1, 最佳用量各为 2%; 稳定剂甘油的最佳浓度为 1.0%。盆栽试验结果显示, 复合菌剂对 6 种化感自毒物质的降解率和对青枯病的抑制率均达到 78% 以上。大田试验结果显示, 100 倍稀释的复合菌剂对连作 15 年烟田中的 6 种化感自毒物质具有显著的降解效果, 并且能明显增加烟株的株高、茎围、腰叶长和腰叶宽, 有效促进了烟草的生长发育; 同时还调节了烟草根围微生物的丰度, 显著抑制了狭义梭菌属 1 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)、劳尔氏菌属(*Ralstonia*)和纤维单胞属(*Cellulomonas*)等的相对丰度, 大幅提高了戴沃斯菌属(*Devosia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和鞘氨醇单胞属(*Sphingomonas*)等的相对丰度。青枯病的发

资助项目: 中国烟草总公司科技重大专项项目[110202101059(XJ-08), 110202201040(XJ-11)]; 湖北省烟草公司科技项目(027Y2021-001)

This work was supported by the Key Technology Projects of China National Tobacco Corporation [110202101059(XJ-08), 110202201040(XJ-11)] and the Technology Projects of Hubei Tobacco Company (027Y2021-001).

*Corresponding author. E-mail: xhb2086@hubu.edu.cn

Received: 2023-07-15; Accepted: 2024-01-18; Published online: 2024-01-19

病率和病情指数也从处理前的 92.22%和 48.19%分别降低到 18.15%和 9.52%, 防效超过了 80.00%。

【结论】本研究优化的复合菌剂显著降低了长期连作烟田青枯病的病情指数, 可为长期连作烟田青枯病的防控提供解决方案。

关键词: 烟草青枯病; 化感自毒物质; 降解菌; 复合菌剂

Optimization and evaluation of a compound bacterial agent degrading autotoxins of tobacco

YANG Wenjuan¹, YU Jun², YANG Chunlei², LI Hao², YANG Jinpeng², YANG Xiaoqiong¹, YANG Yong¹, XIANG Haibo^{1*}

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 Hubei Academy of Tobacco Science, Wuhan 430030, Hubei, China

Abstract: [Background] Long-term continuous cropping of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leads to the accumulation of autotoxins, which aggravates the incidence of tobacco bacterial wilt (TBW) caused by *Ralstonia solanacearum* and causing great economic losses of tobacco production. [Objective] To develop a compound bacterial agent capable of controlling TBW in the field with long-term continuous cropping of tobacco. [Methods] We formulated compound bacterial agents with screened strains capable of degrading autotoxins. Orthogonal design and single factor experiments were employed to optimize the strain ratio and the dosages of additives. The inhibition performance of the compound bacterial agent on TBW was evaluated in a greenhouse and in a field with continuous cropping of tobacco for 15 years. [Results] Orthogonal experiments showed that the optimal ratio of *Bacillus* sp. NO1, *Brucella* sp. NO8, *Bacillus* sp. NO9, and *Bacillus* sp. NO10 in the compound bacterial agent was 1:3:4:2. Single factor experiments showed that the best vector was silica. The best wetting agent and dispersant were sodium hexametaphosphate (SHMP) and sodium butylnaphthalene sulfonate (SBNS), respectively, which were optimized to be added at the dosages of 2%. The optimal concentration of the stabilizer glycerin was 1.0%. Pot experiments showed that both the degradation rate of six autotoxins and the inhibition rate of TBW by the compound bacterial agent reached over 78%. The results of the field experiment showed that the compound bacterial agent diluted by 100 folds had significant degradation effects on six autotoxins in the tobacco field with continuous cropping for 15 years. Moreover, the agent significantly increased the height, stem circumference, and waist leaf length and width of tobacco plants, thus promoting the growth and development of tobacco. In addition, the agent regulated the rhizosphere microbiota of tobacco, as manifested by the

decreased relative abundance of *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Ralstonia*, and *Cellulomonas* and the increased relative abundance of *Devosia*, *Flavobacterium*, and *Sphingomonas*. The agent decreased the incidence rate and disease index of TBW from 92.22% and 48.19% to 18.15% and 9.52%, respectively, with a control effect of 80%. **[Conclusion]** The optimized compound bacterial agent significantly reduces the incidence rate and disease index of TBW in the field with long-term continuous cropping of tobacco, which provides a solution for the prevention and control of TBW.

Keywords: tobacco bacterial wilt; autotoxins; degrading bacteria; compound bacterial agent

烟草青枯病(tobacco bacterial wilt, TBW)是由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种严重的土传细菌性病害,在全球烟草产区广泛发生,已成为世界性难题^[1]。青枯劳尔氏菌不仅可以侵染烟草,还可以侵染茄子、番茄、马铃薯等 50 多个科的数百种作物^[2]。病害一旦发生,会严重影响植株生长发育、烟叶质量,甚至造成整株死亡,对烟草产量和品质有很大影响,已成为制约烟草生产发展的因素。据统计,2015 年因青枯病导致的全国烟草损失高达 5.5 亿元,因此,防控烟草青枯病发生的形势刻不容缓^[3]。

烟草青枯病的发生与多种因素有关,包括烟草品种易感性、土壤营养状况不良、土壤酸化、连作障碍、不宜的气候条件以及技术措施不到位等^[4]。目前防治 TBW 的主要方法有改变耕作制度、土壤改良与消毒、化学农药防治和生物防治等^[5-6]。虽然合理的轮作或间作能一定程度上降低青枯病发病率,但这种方法存在投入大、操作繁琐和经济效益低的问题^[5]。通过使用生石灰、牡蛎粉、生物炭等对酸性土壤进行改良,或是利用夏季暴晒、冬季冷冻、蒸汽消毒和化学药剂对土壤进行消毒,能够显著降低青枯病的发病率,但在防治效果稳定性、适用性和技术成熟度方面存在一定的局限性^[7]。化学农药防治是针对 TBW 公认的最便捷、快速、高效的防治手段,但长期使用存在抗药性和环境污染等问题^[8]。生

物防治技术是一种绿色环保的防治方法,是未来的重要发展方向。目前的主要研究热点是利用微生物抑制青枯劳尔氏菌的生长来防治 TBW,但存在大田应用效果不稳定、适用性差、防治时间短等问题^[8],需要从其他角度开发出新的生物防治方法来弥补这些缺点,完善防治技术。

由于耕地有限、经济利益驱动和种植条件等因素的制约,连作障碍问题在烟草农业生产中日益突出^[4]。在连作的过程中,土壤中会积累烟株根系分泌的化感自毒物质,这些化感自毒物质不仅对烟株自身造成毒害作用,还对根围微生物的群落组成产生极大的影响^[9]。许多研究表明,化感自毒物质对烟草青枯病的发生具有显著的促进作用。一方面,一些化感自毒物质可以通过干扰光合作用、呼吸、膜转运、种子萌发和根组织生长来抑制植物生长,造成作物产量下降^[10]。另一方面,化感自毒物质可以作为碳源促进青枯劳尔氏菌的生长,还可以刺激或诱导病原菌定殖到寄主植物根部,形成生物膜,最终引发青枯病,造成严重的经济损失^[11]。例如,烟草根系分泌的肉桂酸、延胡索酸和草酸可显著诱导青枯劳尔氏菌在烟草根系的定殖,苯甲酸和苯丙酸可强烈刺激青枯劳尔氏菌在根围土壤中的繁殖^[11-13]。因此,如何减少这些化感自毒物质是控制烟草青枯病的关键。

自然界中存在着许多能降解化感自毒物质

的微生物,利用这些微生物来减少化感自毒物质是一种安全、环保的方法。目前,有许多研究已获得能够降解酚类化感自毒物质的细菌和真菌,例如肉桂酸、阿魏酸和 4-羟基苯甲酸分别能被寡养单胞菌、恶臭假单胞菌和克雷伯菌降解^[14-16]。然而,这些降解菌仍处于实验室研究阶段,还没有应用于大田生产中。在前期研究^[17]中我们筛选到了能降解 6 种酚类化感自毒物质的 4 种微生物芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) NO1、布鲁氏菌(*Brucella* sp.) NO8、*Bacillus* sp. NO9 和 *Bacillus* sp. NO10, 其中 *Bacillus* sp. NO1 能够降解苯甲酸(benzoic acid, BA)、对羟基苯甲醛(p-hydroxybenzaldehyde, POBA)和邻苯二甲酸二异辛酯(diisooctyl phthalate, DIOP), *Brucella* sp. NO8 能够降解 2,4-二叔丁基苯酚(2,4-di-tert-butylphenol, DTBP)和 DIOP, *Bacillus* sp. NO9 能够降解 POBA 和邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP), *Bacillus* sp. NO10 能够降解邻苯二甲酸二异丁酯(diisobutyl phthalate, DIBP)和 DIOP。本研究通过正交试验和单因素试验对这 4 种微生物的菌种配比和助剂组进行了优化,并评价了复合菌剂在温室和大田的实际应用效果,为烟草青枯病的防治提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株及植物品种

烟草青枯病原菌(*Ralstonia solanacearum*) 1-1 由湖北省烟草科学研究院提供。化感自毒物质降解菌芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) NO1、布鲁氏菌(*Brucella* sp.) NO8、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) NO9 和 NO10 均为本实验室保存。

试验烟草品种为云烟 87, 种子由湖北省烟

草科学研究院提供。

1.1.2 培养基

NB 培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, pH 7.4–7.6。

LB 培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0。

MS 培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, D-甘露醇 20.0, 琼脂 15.0。

1.1.3 药品试剂

苯甲酸(benzoic acid, BA)、对羟基苯甲醛(p-hydroxybenzaldehyde, POBA)、邻苯二甲酸二异丁酯(diisobutyl phthalate, DIBP)、2,4-二叔丁基苯酚(2,4-di-tert-butylphenol, DTBP)、邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)和邻苯二甲酸二异辛酯(diisooctyl phthalate, DIOP)购自上海源叶生物科技有限公司。硅藻土、白炭黑、膨润土、滑石粉、木质素磺酸钠(sodium lignosulphonate, SLS)、六偏磷酸钠(sodium hexametaphosphate, SHP)、焦磷酸钠(sodium pyrophosphate, SPP)、PEG8000、皂苷(saponins powder, SP)、烷基苯磺酸钠(sodium alkyl benzene sulfonate, SABS)、丁基萘磺酸钠(sodium butylnaphthalenesulfonate, SBS)和甘油购自贵州赛兰博科技有限公司。

1.2 复合菌剂菌株配比优化

采用正交设计,以菌株为因素,以接种量为水平,以青枯病发病率为指标对 4 株化感自毒物质降解菌进行配比优化(表 1)。降解菌 *Bacillus* sp. NO1、*Brucella* sp. NO8、*Bacillus* sp. NO9 和 *Bacillus* sp. NO10 活化后分别接种于 LB 培养基中,37 °C 培养 18 h;青枯劳尔氏菌活化后接种于 NB 培养基中,30 °C 培养 18 h。然后 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,去除上清后用适量的磷酸盐缓冲液(pH 7.2)重悬菌体作为菌液母液。

表 1 菌株配比正交试验表

Table 1 Orthogonal test table for strain ratio

| 水平 Level | 因素 Factor | | | |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | A <i>Bacillus</i> sp. NO1 | B <i>Brucella</i> sp. NO8 | C <i>Bacillus</i> sp. NO9 | D <i>Bacillus</i> sp. NO10 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

烟苗在播种后 60 d 进行移栽, 选择大小均匀的烟株移栽于含 1 kg 灭菌土的盆钵中, 每盆 1 株, 按照当地优质烟叶生产技术规范在温室中进行栽培管理。烟草移栽 3 d 后接种 6 种化感自毒物质(BA、POBA、DIBP、DIOP、DTBP 和 DBP)和青枯劳尔氏菌, 接种量分别为 600 mg/盆(每种化感自毒物质各 100 mg)和 10 mL/盆(1×10^8 CFU/mL)。第 3 天按照表 2 的配比加入复合降解菌(1×10^8 CFU/mL, 10 mL/盆)进行灌根。每个处理烟苗 20 株, 重复 3 次。烟苗移栽 35 d 后, 统计青枯病的发病情况并按公式(1)计算青枯病发病率(disease rate, DR)。

$$DR = D / T \times 100\% \quad (1)$$

式中, DR 为青枯病发病率, D 为观察到的发病植株数目, T 为植株的总数目。

1.3 复合菌剂载体的选择

各降解菌按 1.2 的方法培养后按最佳配比进行混合, 然后将其与不同的载体(硅藻土、白炭黑、膨润土和滑石粉)按体积比 4:1 的比例进行混合, 当载体将发酵液完全吸附后, 于 60 °C 烘箱干燥后研磨成粉末得到制剂母粉。参考 GB/T 5451—2001 和 GB/T 14825—2006 标准分别测定母粉的润湿时间和悬浮率。采用平板菌落计数法测定各制剂母粉室温密闭放置 15 d 后的活菌含量, 选择最优的载体。

1.4 分散剂和润湿剂的选择及用量的优化

选择木质素磺酸钠(SLS)、六偏磷酸钠(SHP)、焦磷酸钠(SPP)、PEG8000 为分散剂的候选材料, 皂苷(SP)、烷基苯磺酸钠(SABS)、丁基萘磺酸钠(SBS)为润湿剂的候选材料。将各润湿剂和分散剂按 1% 的用量分别与母粉混合, 烘干并研磨成粉末, 润湿时间、悬浮率和活菌含量测定方法同 1.3, 根据结果筛选出最佳润湿剂和分散剂。

确定最佳分散剂和润湿剂后, 将分散剂和润湿剂按质量比 5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4 和 1:5 混合, 再与母粉混合后经烘干制成粉剂, 测定其悬浮率和润湿时间, 选出分散剂和润湿剂的最佳质量配比。然后将分散剂和润湿剂的总添加量按 1%、2%、3%、4%、5% 和 6% 的用量与母粉混合, 烘干制成粉剂后测定悬浮率和润湿时间, 得到润湿剂与分散剂的最佳用量。

1.5 复合菌剂稳定剂的选择及用量的优化

在载体、助剂筛选的基础上, 选取碳酸钙、甘油、磷酸氢二钾和羧甲基纤维素钠(CMC-Na)作为菌剂的稳定剂, 按 0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的比例与母粉混合, 参考 GB/T 19136—2021 标准将其在(54 ± 2) °C 条件下保存 14 d, 或者在密封的室温条件下保存 90 d, 测定活菌的含量, 得到最佳稳定剂及其最佳用量。

1.6 复合菌剂的质量指标检测

含孢量、杂菌率、水分含量、细度及 pH 测定: 参照 GB 20287—2006 标准。

润湿时间和悬浮率测定: 方法同 1.3。

1.7 复合菌剂在温室栽培中的效果评价

试验分为 4 组: CK1 组, 无菌土中加入 6 种化感自毒物质; CK2 组, 无菌土中加入青枯劳尔氏菌; TG1 组, 无菌土中加入青枯劳尔氏菌和 6 种化感自毒物质; TG2 组, 无菌土中加入青枯劳尔氏菌、6 种化感自毒物质和最优的复合菌剂(100 倍稀释的 10 mL 复合菌剂, 有效菌液浓度约为 2×10^8 CFU/mL)。试验方法同 1.2。

1.7.1 化感自毒物质降解情况分析

取各处理组根围土壤 50 g, 用 150 mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 浓缩后再溶于 1 mL 甲醇, 通过 HPLC 检测复合菌剂对化感自毒物质的降解效率。液相色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流动相为甲醇水溶液。流速为 1 mL/min, 检测波长为 227 nm (POBA、BA), 245 nm (DIOP、DIBP 和 DBP), 275 nm (DTBP)。

1.7.2 烟草青枯病发病率(DR)的统计

计算方法同 1.2。

1.8 复合菌剂在大田生产中的效果评价

大田试验地点位于湖北省利川市柏杨县(108 $^{\circ}$ 21'E, 29 $^{\circ}$ 42'N)。年平均气温 16.7 $^{\circ}$ C, 年平均降雨量 1 304 mm, 年平均日照时间 2 096.8 h。试验选用云烟 87 品种, 按 GB/T 23221—2008 标准进行栽培。试验烟田为连作 15 年烤烟的烟田, 过去 5 年青枯病的发病率均大于 90%。试验烟田面积 720 m², 平均分为 12 块, 每块 60 m², 种植 90 株烟株。采用 N:P₂O₅:K₂O=1.0:1.5:2.5, 氮肥施用量为 90 kg/hm² 的复合肥进行施肥。试

验分为 4 组: CK, 不施用复合菌剂; TF1 组, 用 10 倍稀释的 100 mL 复合菌剂(有效菌液浓度约为 2×10^9 CFU/mL)灌根处理, 在烟苗移栽当天和 30 d 后各施用一次; TF2 组, 用 100 倍稀释的 100 mL 复合菌剂(有效菌液浓度约为 2×10^8 CFU/mL)灌根处理, 其他条件同 TF1 组; TF3 组, 用 1 000 倍稀释的 100 mL 复合菌剂(有效菌液浓度约为 2×10^7 CFU/mL)灌根处理, 其他条件同 T1 组。

1.8.1 烟草农艺性状统计

在烤烟成熟期(打顶后 7 d), 参照 YC/T 142—2010 标准记载成熟期烟株农艺性状, 包括株高(plant height, PH)、茎围(stem girth, SG)、腰叶长(waist leaf length, WL)和宽(waist leaf width, WW)。

1.8.2 化感物自毒物质降解情况分析

采用五点取样法收集各个处理组的根围土, 将根围疏松的土壤抖落掉, 收集与根黏附紧密的土样, 混合后取 50 g 进行化感自毒物质降解情况分析, 方法同 1.7。

1.8.3 烟草青枯病发病情况的统计

按照《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/T 23222—2008)调查青枯病发病情况。0 级: 全株无病; 1 级: 茎部偶有褪绿斑, 或病侧 1/2 以下叶片凋萎; 3 级: 茎部有黑色条斑, 但不超过茎高 1/2, 或病侧 1/2—2/3 叶片凋萎; 5 级: 茎部黑色条斑超过茎高 1/2, 但未到达茎顶部, 或病侧 2/3 以上叶片凋萎; 7 级: 茎部黑色条斑到达茎顶部, 或病株叶片全部凋萎; 9 级: 病株基本枯死。青枯病发病率(DR)按公式(1)计算, 青枯病病情指数(disease index, DI)按公式(2)计算, 生防效果(control effect, CE)按公式(3)计算。

$$DI = \sum(D \times G) / (T \times 9) \times 100\% \quad (2)$$

式中, DI 为病情指数, G 为发病植株的病情级别, D 为 G 级别的发病植株数目, T 为植株的总数目。

$$CE = (DI_{CK} - DI_T) / DI_{CK} \times 100\% \quad (3)$$

式中, CE 为生防效果, DI_{CK} 为对照组病情指数, DI_T 为处理组病情指数。

1.8.4 烟叶烤后产量和品质分析

各处理单独采烤, 进行烤后烟叶外观质量鉴定, 参照 GB 2635—1992 烤烟标准对烟叶进行分级, 统计烤后各处理的产量、产值、均值等经济性状, 并计算上、中等烟比例。

1.8.5 微生物多样性测定

采用五点取样法分别采集 CK 组和 TF2 组烟草移栽后 0 d 和 90 d 的根围土壤样品。将根围疏松的土壤抖落掉, 收集与根黏附紧密的土样送至上海美吉生物医药科技有限公司应用 16S RNA V3-V4 区域特异引物进行 16S 多样性测序, 上游引物序列为 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3', 下游引物序列为 5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3'。测序原始数据已上传至国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDC40041463。

1.9 数据处理

测得序列使用 Trimmomatic (v0.36)、Pear (v0.9.6)、Flash (v1.20) 和 Vsearch (v2.7.1) 软件进行质控与拼接处理, 得到的序列通过与 Silva 数据库 (<https://www.arb-silva.de/>) 进行比对检测来去除嵌合体序列, 最终得到高质量序列。使用 QIIME2 软件以 97% 的一致性将序列聚类成为可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 并注释, 然后计算各样本的 α 多样性指数。所有数据采用 SPSS 22.0 进行差异性分析, 用 ANOVA 单因素方差分析法进行方差分析, 邓肯 (Duncan) 多重检验法检验处理间的差异显著性

($P < 0.05$)。使用 R 语言的 pheatmap 包绘制物种丰度柱形图。

2 结果与分析

2.1 复合菌剂菌株配比优化的结果

正交试验优化结果表明, 对降低盆栽烟草青枯病发病率影响最大的是 *Bacillus* sp. NO9, 其次是 *Bacillus* sp. NO1 和 *Brucella* sp. NO8, *Bacillus* sp. NO10 的影响最小 (表 2 和表 3)。最佳的接种组合为 $A_1B_2C_4D_3$, 即 *Bacillus* sp. NO1:*Brucella* sp. NO8:*Bacillus* sp. NO9:*Bacillus* sp. NO10=1:2:4:3。进一步对最优菌株配比进行验证, 结果显示盆栽烟草青枯病发病率为 16.67%, 比基础菌株配比 (1:1:1:1, DR=20.37%) 降低了 18.16%。

2.2 复合菌剂载体优化的结果

以白炭黑作为载体的复合菌剂的润湿时间最短 (25.8 s), 其母粉放置 15 d 后活菌数量最多 (2.02×10^{10} CFU/g), 吸附量 (1.46 L/kg) 和悬浮率 (64.39%) 仅次于膨润土, 其余材料次之 (图 1)。综合比较所选材料对复合菌剂吸附性、分散性及稳定性的影响, 最终选择白炭黑作为菌剂载体。

2.3 复合菌剂分散剂和润湿剂的选择及配比优化的结果

最佳的分散剂和润湿剂是六偏磷酸钠 (SHP) 和丁基萘磺酸钠 (SBS), 其悬浮率分别为 68.80% 和 66.22%, 润湿时间分别为 23.6 s 和 34.4 s, 复合菌剂存放 15 d 后活菌数量分别为 1.88×10^{10} CFU/g 和 1.84×10^{10} CFU/g (图 2A、2B)。进一步将 SHP、SBS 和母粉按照一定的比例混合, 发现当 SHP 和 SBS 的质量比为 1:1、总用量为 4% 时效果最好, 悬浮率为 75.87%, 润湿时间为 28.8 s (图 2C、2D)。

表 2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test

| 编号 Code | 因素 Factor | | | | 发病率 DR (%) |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------|
| | A: <i>Bacillus</i> sp. NO1 | B: <i>Brucella</i> sp. NO8 | C: <i>Bacillus</i> sp. NO9 | D: <i>Bacillus</i> sp. NO10 | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 20.37 |
| 2 | 3 | 3 | 1 | 3 | 27.78 |
| 3 | 4 | 4 | 1 | 4 | 29.63 |
| 4 | 2 | 2 | 1 | 2 | 25.93 |
| 5 | 2 | 4 | 3 | 1 | 24.88 |
| 6 | 4 | 3 | 2 | 1 | 27.78 |
| 7 | 3 | 2 | 4 | 1 | 22.22 |
| 8 | 1 | 4 | 4 | 3 | 16.67 |
| 9 | 4 | 1 | 4 | 2 | 24.07 |
| 10 | 1 | 3 | 3 | 2 | 20.85 |
| 11 | 2 | 3 | 4 | 4 | 18.52 |
| 12 | 2 | 1 | 2 | 3 | 27.81 |
| 13 | 3 | 1 | 3 | 4 | 24.74 |
| 14 | 3 | 4 | 2 | 2 | 27.06 |
| 15 | 4 | 2 | 3 | 3 | 18.52 |
| 16 | 1 | 2 | 2 | 4 | 24.25 |
| K_1 | 71.14 | 85.57 | 93.19 | 83.73 | |
| K_2 | 84.14 | 78.79 | 94.90 | 85.43 | |
| K_3 | 88.90 | 82.45 | 74.48 | 78.65 | |
| K_4 | 87.87 | 85.24 | 69.48 | 84.24 | |
| k_1 | 17.78 | 21.39 | 23.30 | 20.93 | |
| k_2 | 21.03 | 19.70 | 23.72 | 21.36 | |
| k_3 | 22.22 | 20.61 | 18.62 | 19.66 | |
| k_4 | 21.97 | 21.31 | 17.37 | 21.06 | |
| R | 4.44 | 1.70 | 6.35 | 1.69 | |
| 因素主次 Priority of each factor | $C>A>B>D$ | | | | |
| 最优组合 Optimal composition | $A_1B_2C_4D_3$ | | | | |

K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 表示因素中 4 个水平的发病率的总和; k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 表示因素中 4 个水平发病率的平均值; R 表示极差
 K_1 , K_2 , K_3 and K_4 represent the sum of DR of the four levels in the factor; k_1 , k_2 , k_3 and k_4 represent the average value of DR at four levels among the factors; R stands for range.

表 3 单变量方差分析结果

Table 3 ANOVA analysis results of variance

| 变异来源 Source | 平方和 Sum of squares | 自由度 df | 均方 Mean square | F 值 F value | P 值 P value |
|----------------|-----------------------|-------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| A | 50.121 | 3 | 16.707 | 1.485 | 0.376 |
| B | 7.412 | 3 | 2.471 | 0.220 | 0.878 |
| C | 125.207 | 3 | 41.736 | 3.710 | 0.155 |
| D | 6.724 | 3 | 2.241 | 0.199 | 0.891 |
| 误差 Error | 33.745 | 3 | 11.248 | | |
| 总计 Total | 223.210 | 16 | | | |

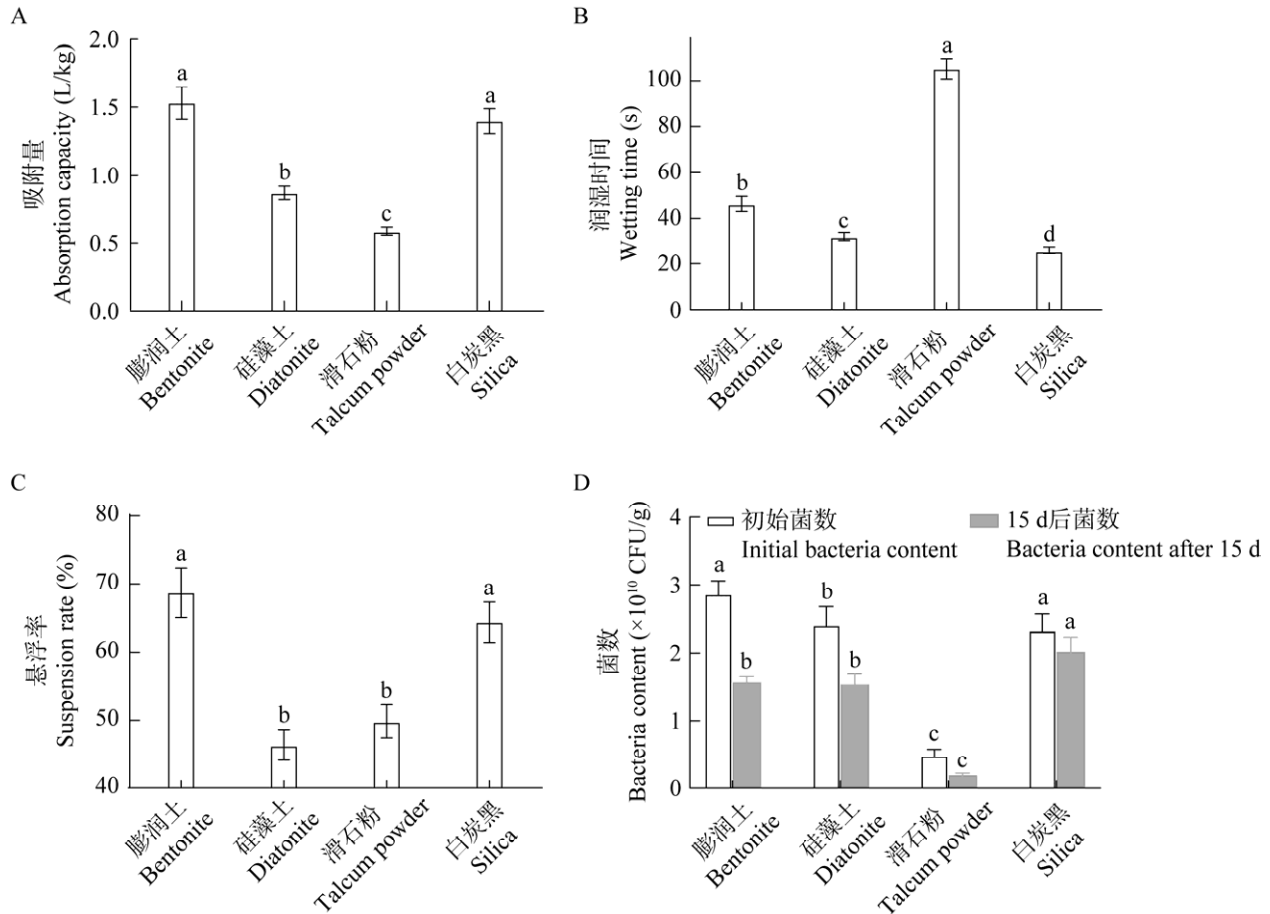


图1 载体对复合菌剂的影响 A–D表示4种载体的吸附能力、润湿时间、悬浮率及稳定性测定. 不同小写字母表示0.05水平上的差异. 下同

Figure 1 The influence of carrier on compound bacterial agents. The adsorption capacity (A), wetting time (B), suspension rate (C) and stability (D) of four kinds of carriers were determined. Different lowercase letters indicate differences at the 0.05 level. The same below.

2.4 复合菌剂稳定剂的选择及其用量优化的结果

最佳的稳定剂是甘油, 添加1.0%甘油的复合菌剂在 (54 ± 2) °C存放14 d后其微生物的存活率为72.68% (图3A), 在室温密闭贮藏90 d后存活率为80.34% (图3B)。

2.5 复合菌剂质量指标检测结果

复合菌剂活菌含量为 2.03×10^{10} CFU/g, 不含有杂菌, 悬浮率为78.06%, 润湿时间为34.8 s, pH为7.4, 细度为98%, 水分为2.7% (表4), 符

合农用微生物菌剂国家标准(GB 20287—2006)。

2.6 复合菌剂在温室栽培中的试验结果

通过对比对照组CK1、处理组TG1和加了复合菌剂的处理组TG2, 发现使用复合菌剂处理30 d后的TG2组中6种化感自毒物质的含量明显比其他两组低, 其中POBA的残余量最高(15.13 mg/kg-土壤), DIBP的残余量最低(5.37 mg/kg-土壤) (图4), 表明复合菌剂可以高效、快速地降解土壤中的多种化感自毒物质。

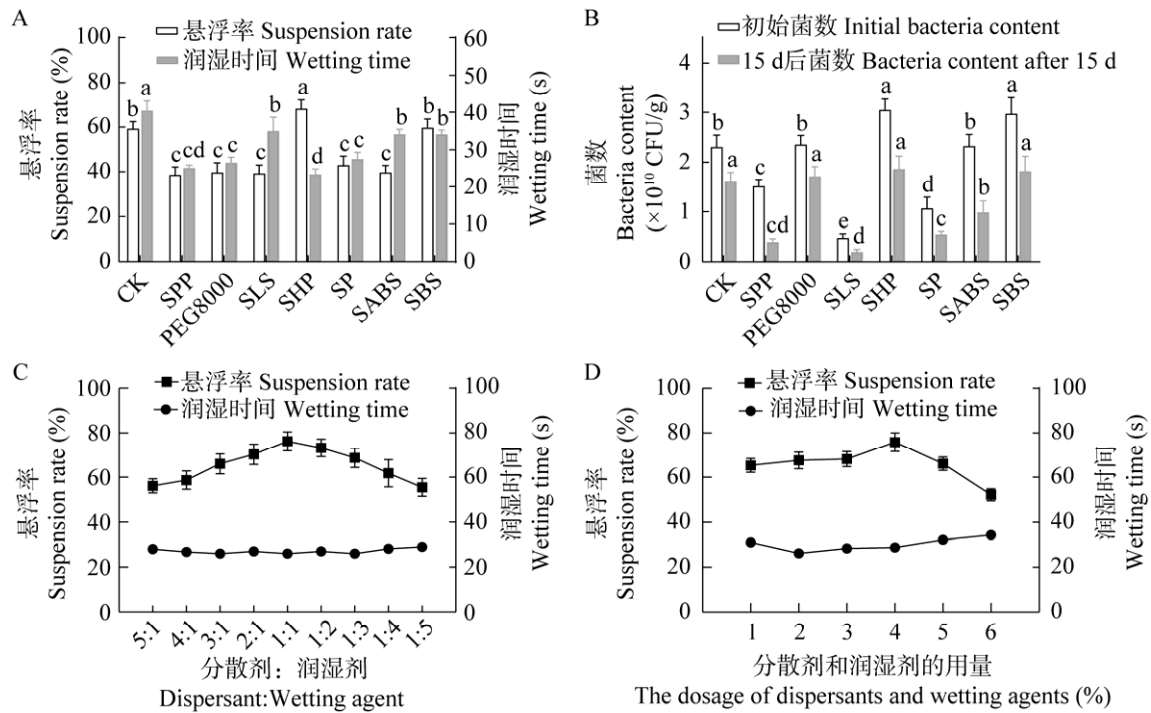


图 2 分散剂和润湿剂对复合菌剂的影响及其用量的优化 A、B: 7种分散剂和润湿剂的悬浮率、润湿时间和稳定性测定. C、D: 分散剂和润湿剂的配比和用量优化. SLS: 木质素磺酸钠; SHP: 六偏磷酸钠; SPP: 焦磷酸钠; SP: 皂苷; SABS: 烷基苯磺酸钠; SBS: 丁基萘磺酸钠

Figure 2 Selection and dosage optimization of dispersants and wetting agents. A, B: Determination of suspension rate, wetting time and stability of seven dispersants and wetting agents. C, D: Optimization of the ratio and dosage of dispersant and wetting agent. SLS: Sodium lignosulphonate; SHP: Sodium hexametaphosphate; SPP: Sodium pyrophosphate; SP: Saponins powder; SABS: Sodium alkyl benzene sulfonate; SBS: Sodium butylnaphthalenesulfonate.

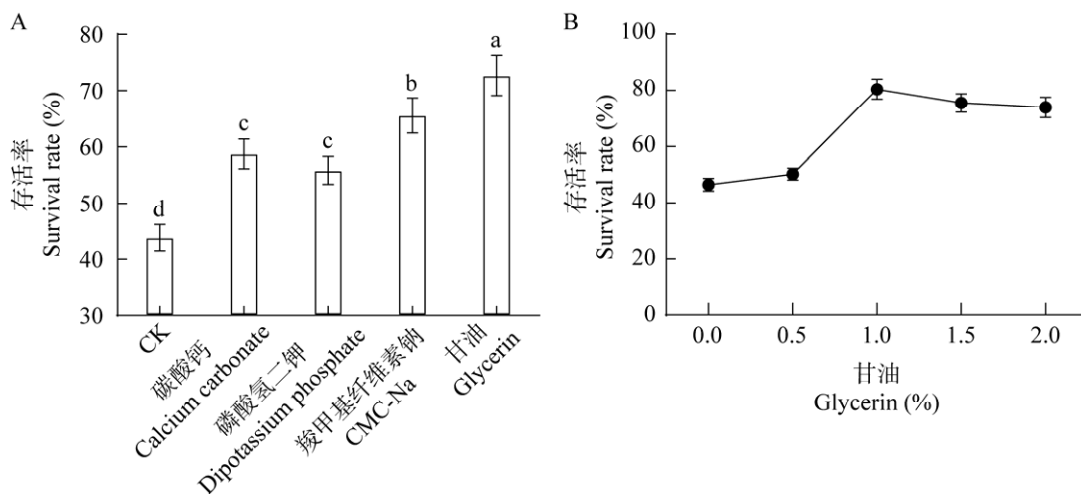


图 3 稳定剂对复合菌剂的影响及其用量的优化 A: 4种稳定剂对复合菌剂热贮稳定性的影响. B: 甘油用量的优化

Figure 3 Selection and dosage optimization of stabilizers. A: The influence of stabilizers on thermal storage stability. B: Optimization of glycerin dosage.

表 4 可湿性粉剂质量指标检测

Table 4 Quality inspection of wettable powder

| 指标 Index | 国家标准 National standard | 测量值 Measuring value |
|---|------------------------|-----------------------|
| 活菌含量 Living bacteria content (CFU/g) | $\geq 2 \times 10^8$ | 2.03×10^{10} |
| 杂菌率 Contaminating microorganism rate (%) | $\leq 20\%$ | 0 |
| 悬浮率 Suspension rate (%) | ≥ 70 | 78.06 \pm 2.22 |
| 润湿时间 Wetting time (s) | ≤ 180 | 34.80 \pm 1.17 |
| pH 范围 pH range | 5.5–8.5 | 7.40 \pm 0.11 |
| 细度 Fineness (%) | ≥ 80 | 98.00 \pm 0.60 |
| 水分 Water content (%) | ≤ 35 | 2.70 \pm 0.14 |

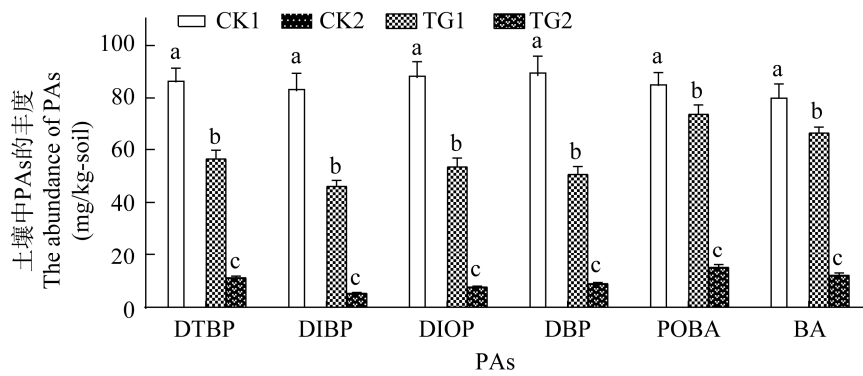


图 4 复合菌剂对盆栽土壤中化感自毒物质的降解

Figure 4 Degradation of PAs in pot soil by compound bacterial agents.

青枯病发病情况统计发现 CK2 组的发病率为 48.33%，TG1 组的发病率为 80.00%，而 TG2 组的发病率仅为 16.67%，分别比 CK2 组和 TG1 组降低了 31.66%和 63.33%，比优化前的发病率 (20.37%)降低了 18.16% (图 5)，表明复合菌剂对烟草青枯病具有较好的防控效果。

2.7 复合菌剂在大田栽培中的试验结果

烟苗移栽 90 d 后 3 个处理组烟株的农艺性状几乎全部和 CK 组的农艺性状表现出明显的差异，其中用 100 倍稀释的复合菌剂(TF2)处理的烟株的株高(106.36 cm)、茎围(9.51 cm)、腰叶长(78.12 cm)和腰叶宽(28.73 cm)等农艺性状最

好，10 倍稀释的复合菌剂(TF1)处理的次之，1 000 倍稀释的复合菌剂(TF3)处理的最差(表 5)，表明复合菌剂 100 倍稀释液处理对烟草的促生作用最好。

烟苗移栽 90 d 后 6 种化感自毒物质均被检测到，其中 DBP 的含量最高，达到 5.2 mg/kg-干土 (图 6)。经过不同稀释倍数的复合菌剂处理后，6 种化感自毒物质的含量均明显降低，其中用 100 倍稀释的复合菌剂(TF2)处理的效果最好，降解率分别达到了 65.63% (DTBP)、76.32% (DIBP)、84.42% (DIOP)、75.00% (DBP)、42.10% (POBA)和 55.56% (BA)。

大田青枯病发病情况统计结果显示 CK 组的发病率(DR)为 92.22%，病情指数(DI)为 48.19%。与 CK 组相比，各处理组均能显著降低青枯病的发病率和病情指数，其中 TF2 组的防控效果最好,DR 和 DI 分别为 18.15%和 9.52%，比 CK 组分别下降了 74.07%和 38.67%，防治效果超过了 80.00% (图 7)，表明采用复合菌剂 100 倍稀释液处理可以显著降低青枯病的发生。

对大田烤后烟的经济性状进行统计,各处理组烤烟的经济性状均高于对照组，其中 TF2 组的上等烟比例(40.18%)、上中等烟比例(80.33%)和均价(19.91 元/kg)最高(表 6)，显著提高了烟株的经济价值。

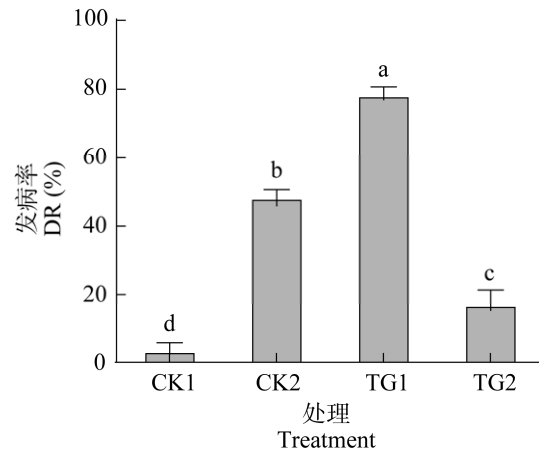


图 5 复合菌剂对盆栽烟草青枯病发病率的影响
Figure 5 Effects of compound bacterial agents on the DR of TBW in pot experiments.

表 5 复合菌剂对烟草农学性状的影响

Table 5 Effects of compound bacterial agents on agronomic traits of tobacco

| 处理 Treatment | 株高 PH (cm) | 茎围 SG (cm) | 腰叶长 WL (cm) | 腰叶宽 WW (cm) |
|--------------|--------------|------------|-------------|--------------|
| CK | 85.11±4.05c | 7.65±0.62c | 70.89±3.18b | 25.85±1.88b |
| TF1 | 102.09±6.25a | 9.28±0.41a | 76.49±4.47a | 28.31±1.26ab |
| TF2 | 106.36±6.59a | 9.51±0.62a | 78.12±4.81a | 28.73±1.63a |
| TF3 | 94.22±4.78b | 8.36±0.58b | 74.67±3.29a | 27.21±2.01ab |

同一列不同的小写字母表示处理间存在显著性差异($P<0.05$). 下同

Different letters indicate significant difference ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test. The same below.

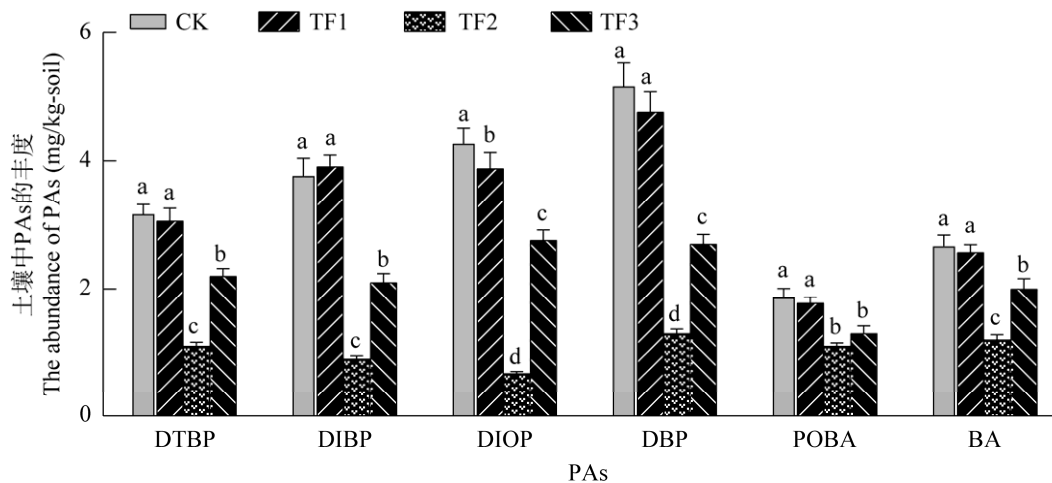


图 6 复合菌剂对连作土壤中化感自毒物质的降解

Figure 6 Degradation of PAs in continuous cropping soil by compound bacterial agents.

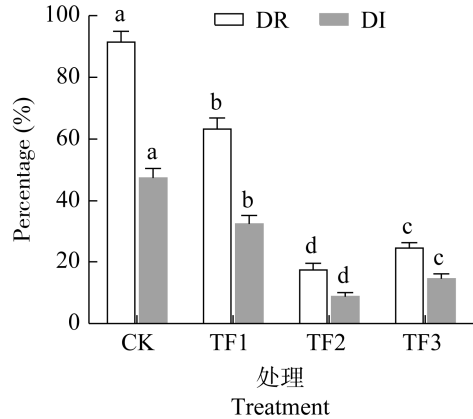


图 7 复合菌剂对大田烟草青枯病发病率和病情指数的影响

Figure 7 Effects of compound bacterial agents on the DR and DI of TBW in field experiments.

最后,我们比较了施用复合菌剂与否烟株根围土细菌群落的变化。未使用复合菌剂处理的情况下,烟株移栽 90 d 后其根围土细菌 OTU 数量, Shannon 指数、Simpson 指数、Ace 指数和 Chao1 指数均下降。而在施用复合菌剂后,根围土细菌 OTU 丰度从 814 个增加到 1 196 个,增幅 31.94%; Shannon 指数增加了 24.64%, Simpson 指数增加了 12.27%, Ace 指数和 Chao1 指数分别增加了 39.20% 和 41.24% (表 7), 表明施用复合菌剂既能增加烟草根围土中细菌群落的多样性,又可以提高其中细菌群落的丰富度。

表 6 复合菌剂对烟草经济性状的影响

Table 6 Effects of compound bacterial agents on economic properties of tobacco

| 处理 Treatments | 上等烟比例 Rate of first-class tobacco (%) | 中等烟比例 Rate of medium-class tobacco (%) | 均价 Average price (RMB/kg) |
|---------------|--|---|------------------------------|
| CK | 20.79±1.55d | 56.74±2.36c | 17.30±1.11c |
| TF1 | 37.92±2.04b | 72.20±3.95a | 18.55±1.06b |
| TF2 | 40.18±2.29a | 80.33±4.05a | 19.91±1.34a |
| TF3 | 34.75±1.72c | 66.27±3.12b | 18.02±1.18bc |

表 7 复合菌剂对烟草根围土壤细菌 OTU 丰度和 α 多样性的影响

Table 7 Effects of compound bacterial agents on OTU richness and alpha diversity indices of rhizosphere soil bacterial communities

| Sample | OTU | Shannon | Simpson | Ace | Chao1 | Coverage |
|----------|-----------|--------------|--------------|-------------------|----------------|-------------|
| CK-0 d | 757±19b | 3.513±0.238c | 0.805±0.032b | 1 206.890±78.360b | 74.799±3.211b | 0.991±0.002 |
| CK-90 d | 701±18b | 2.957±0.204c | 0.587±0.027c | 974.538±31.248c | 58.997±2.018d | 0.993±0.001 |
| TF2-0 d | 814±27b | 4.236±0.355b | 0.823±0.045b | 1 064.880±40.332c | 65.715±2.337c | 0.994±0.002 |
| TF2-90 d | 1 196±94a | 5.621±0.414a | 0.924±0.047a | 1 751.405±50.751a | 111.829±3.916a | 0.987±0.006 |

根据各 OTU 中代表序列的物种注释结果,我们进一步分析了复合菌剂处理后烟草根围土壤细菌在门水平(丰度排名前 10)和属水平(丰度排名前 35)上的群落结构变化。门水平上丰度排

名前 10 的种类为变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、拟

杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、unclassified Bacteria、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和浮霉菌门(*Planctomycetes*) (图 8A)。与 CK 相比, TF2 组在烟苗移栽 90 d 后其根围土细菌在门水平上的组成丰度有显著差异, 其中变形菌门、放线菌门、绿弯菌门和厚壁菌门的丰度分别增加了 35.71%、126.93%、24.22% 和 388.04%, 而酸杆菌门、芽单胞菌门、疣微菌门和浮霉菌门分别减少了 54.71%、33.62%、72.32% 和 75.11%。

施用复合菌剂 90 d 后, 丰度排名前 35 个属中有 16 个属的相对丰度发生了显著变化, 其中狭义梭菌属 1 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)、劳

尔氏菌属 (*Ralstonia*)、纤维单胞属 (*Cellulomonas*)、醋酸杆菌属(*Acidibacter*)、土孢杆菌属 (*Terrisporobacter*)、假单胞属 (*Pseudomonas*)、寡养单胞属(*Stenotrophomonas*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)的相对丰度大幅下降, 戴沃斯菌属 (*Devosia*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、鞘氨醇单胞属 (*Sphingomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)和沙壤土杆菌属 (*Ramlibacter*)的相对丰度增加, 但相对丰度增加的微生物数量比相对丰度降低的微生物数量少 (图 8B, 表 8)。

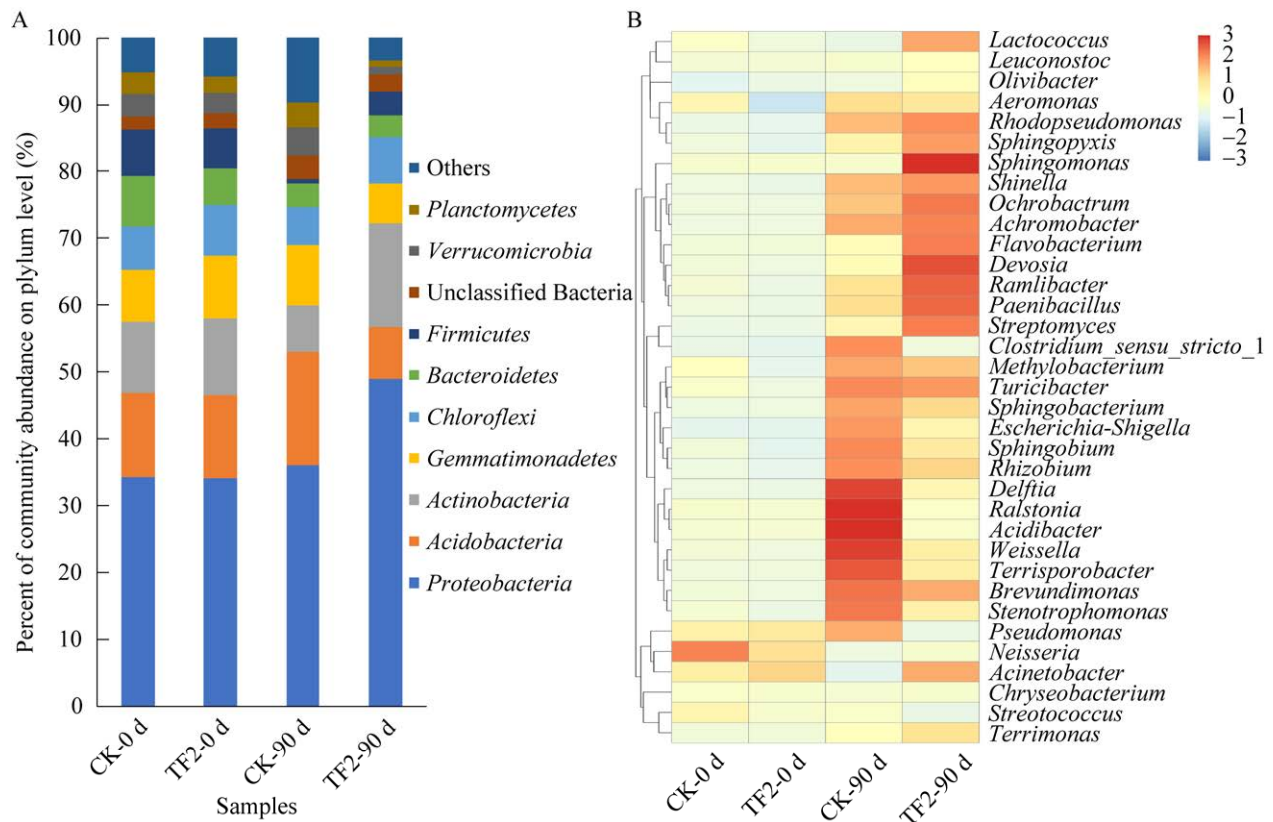


图 8 复合菌剂对烟草根围土壤细菌群落结构的影响。 A: 门水平. B: 属水平

Figure 8 Effects of compound bacterial agents on the bacteria community structure of tobacco rhizosphere soil at the phylum (A) and genus (B) levels.

表 8 复合菌剂处理 90 d 后在属水平丰度上具有显著差异的根围土细菌

Table 8 The rhizosphere bacteria with significantly differences at genus level after 90 d of treatment

| 物种 Genus | CK 中物种的相对丰度 Relative abundance of genus in CK | TF2 组中物种的相对丰度 Relative abundance of genus in TF2 | 显著差异水平 P 值 Significant difference level P value | 物种相对丰度的升降 The rise/fall of relative abundance of genus |
|------------------------------------|---|--|---|--|
| <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> | 0.007 3±0.004 1 | 0.001 6±0.002 6 | 0.011 4 | ↓ |
| <i>Ralstonia</i> | 0.031 6±0.010 5 | 0.002 2±0.000 4 | 0.017 0 | ↓ |
| <i>Devosia</i> | 0.005 2±0.002 5 | 0.024 5±0.005 0 | 0.022 1 | ↑ |
| <i>Acidibacter</i> | 0.030 1±0.008 6 | 0.002 3±0.001 2 | 0.021 1 | ↓ |
| <i>Flavobacterium</i> | 0.005 3±0.001 4 | 0.022 0±0.007 5 | 0.038 0 | ↑ |
| <i>Sphingomonas</i> | 0.001 2±0.000 3 | 0.029 4±0.002 2 | 0.002 8 | ↑ |
| <i>Acinetobacter</i> | 0.001 0±0.000 2 | 0.011 7±0.004 1 | 0.021 3 | ↑ |
| <i>Lactococcus</i> | 0.001 8±0.000 7 | 0.010 5±0.002 2 | 0.018 1 | ↑ |
| <i>Streptomyces</i> | 0.003 4±0.001 0 | 0.009 6±0.001 9 | 0.038 6 | ↑ |
| <i>Delftia</i> | 0.026 9±0.002 6 | 0.002 4±0.001 0 | 0.023 2 | ↓ |
| <i>Terrisporobacter</i> | 0.012 8±0.001 4 | 0.002 8±0.000 9 | 0.018 9 | ↓ |
| <i>Paenibacillus</i> | 0.003 5±0.000 4 | 0.005 9±0.000 9 | 0.029 3 | ↑ |
| <i>Ramlibacter</i> | 0.002 9±0.000 6 | 0.005 4±0.000 7 | 0.024 3 | ↑ |
| <i>Pseudomonas</i> | 0.010 5±0.003 4 | 0.001 3±0.000 4 | 0.030 2 | ↓ |
| <i>Stenotrophomonas</i> | 0.018 6±0.002 7 | 0.005 1±0.000 9 | 0.040 7 | ↓ |
| <i>Weissella</i> | 0.028 4±0.002 1 | 0.007 7±0.001 1 | 0.022 1 | ↓ |

3 讨论与结论

近年来许多研究均表明化感自毒物质是导致烟草连作障碍的主要原因之一^[12,18]。长期连作条件下化感自毒物质的积累会影响植株代谢,导致病虫害暴发,轻则减产,重则绝收,严重制约了烟草生产的可持续发展,因此消减这些化感自毒物质是防控烟草病害和消除连作障碍的一种重要策略^[17]。目前发现的烟草化感自毒物质有草酸、苹果酸、柠檬酸、肉桂酸、肉豆蔻酸、延胡索酸、苯甲酸(BA)、苯丙酸、丁二酸、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)、邻苯二甲酸二辛酯和邻苯二甲酸二异辛酯(DIOP)等^[11-13,19],能够降解这些化感自毒物质的微生物也有一些报道^[14-16],然而,利用微生物同时降解多种化感自毒物质并应用于 TBW 的生物防治却鲜有报道。本研究将 4 株能够降解 BA、POBA、DIBP、DTBP、DBP

和 DIOP 这 6 种化感自毒物质的降解菌制作成复合菌剂并应用于大田生产具有一定的新颖性。

本研究的复合菌剂包含 3 种芽孢杆菌和 1 种布鲁氏菌。芽孢杆菌被广泛用于防治各种植物病害,如青枯病、根腐病、霜霉病、软腐病、稻瘟病和纹枯病等^[20],还可以作为根围促生菌,通过降解有机化合物释放植物养分和分泌促生物质来提高根系活力、优化根系结构、促进植物生长^[21]。布鲁氏菌存在于多种环境中,包括水、土壤、植物和动物,在芳烃的降解、新型抗生素和生物表面活性剂的生产等方面具有重要的应用价值^[22],但尚未发现其具有降解化感自毒物质的功能。本研究的布鲁氏菌能够降解 DTBP 和 DIOP,表明布鲁氏菌具有作为一种生防菌而用于植物病害防治的潜能,拓展了布鲁氏菌的应用范围。

生防菌由于其运输、存储和作物生长环境

(土壤 pH 值、田间温湿度及根系分泌物等)因素的影响会造成其防治效果降低或不稳定,从而影响其推广应用,剂型的制备有利于生防菌的保护、稀释和缓释有效成分,保证了生防菌正常功能的发挥^[23]。可湿性粉剂因其生产成本低、有效成分含量高、对植物和环境安全而作为目前微生物农药应用的主要剂型之一,在生物防治中应用比较成熟。可湿性粉剂是由原药(微生物活菌或化合物)、惰性填料(吸附载体)、分散剂、润湿剂、稳定剂和保护剂等助剂混合后得到一定细度的制剂,不仅可以提高防效,还能降低成本^[24]。李舒雯^[25]报道以 10%的滑石粉作为载体、2%的 CMC-Na 作分散剂、7%的木质素磺酸钙作润湿剂、0.1%的糊精作为保护剂时,内生短短芽孢杆菌 011 可湿性粉剂的各项指标最优,菌剂芽孢含量达 1.8×10^{10} CFU/g,悬浮率为 76%,润湿时间为 52 s。郭庄园等^[26]开发的枯草芽孢杆菌 262XY2'可湿性粉剂中最佳载体为白炭黑,润湿分散剂为 10%的十二烷基硫酸钠,稳定剂为 2%磷酸二氢钾,其活菌数为 2.19×10^{10} CFU/g,悬浮率为 84%,润湿时间为 23.8 s,杂菌率为 0.8%。本研究制备的可湿性粉剂的质量[活菌数为 2.03×10^{10} CFU/g,悬浮率为 $(78.06 \pm 2.22)\%$,润湿时间为 (34.80 ± 1.17) s,杂菌率为 0]优于前者但不及后者,其原因可能是因为芽孢杆菌的种类不一样,所用的助剂也不一样导致的。

我们从化感自毒物质降解效率和青枯病防治效果两方面对复合菌剂在温室和大田中的效果进行了评价。复合菌剂对 6 种化感自毒物质的降解率在 42%–95%,表明复合菌剂能降解土壤中的化感自毒物质,但不能像在液体培养基中一样对化感自毒物质进行完全降解,其原因可能是土壤中降解菌的生存环境,包括养分、pH、温度和湿度与培养液中不同且更为严峻,导致烟草生长过程中降解菌的繁殖能力和定殖能力下

降,从而导致降解率的下降^[17]。复合菌剂 100 倍稀释液处理(TF2 组)在盆栽和田间试验中对青枯劳尔氏菌的防效均在 80%左右,高于皮静^[27]通过利用哈茨木霉 TMN-1 降解自毒物质肉桂酸来防治青枯病的效果(54%),但比解淀粉芽孢杆菌 ZM9 与万寿菊粉混合菌剂^[28]的防效要稍差(83%),其原因可能是单一作用方式的生防菌剂存在功能单一、适应能力差、易产生抗性等问题,使得防治效果不理想,而将不同功能的生防菌或生防试剂组合得到多功能性、优势互补的复合菌剂是生防菌剂的发展趋势^[29]。

在大田试验中,我们发现高浓度的复合菌剂(10 倍稀释)对青枯病的防治效果和对烟草生长的促进效果优于低浓度的复合菌剂(1 000 倍稀释),但不及中浓度的复合菌剂(100 倍稀释),其原因可能是在一定浓度范围内,青枯病的防治和烟株的促生效果会随着复合菌剂浓度的提高呈现增加趋势,但促进作用会出现阈值。若复合菌剂的浓度过高,一方面会因为其浓度高而成为根围优势菌群,会与根围其他微生物包括有益菌和有害菌竞争营养和生态位点,在抑制有害菌的同时也抑制了有益菌,导致微生物群落结构单一^[30];另一方面会对土壤的理化性质产生负面影响,导致土壤 pH、过氧化氢酶、蛋白酶和硝酸还原酶的活性降低,不利于青枯病的防治和烟株的生长^[31]。另外高浓度的菌剂会增加经济成本,在田间大规模应用时会造成严重浪费,因此我们选择复合菌剂 100 倍稀释液进行田间应用。

化感自毒物质诱导植物病害发生的机制有直接作用与间接作用两种,直接作用是直接促进土壤病原微生物在宿主根部定植和繁殖,间接作用是改变了植物根围土壤微生物的区系结构特征,导致土壤理化性质发生变化、微生物多样性下降、结构单一、根围有益微生物数量减少和有害微生物种群增加,最终导致土传病害暴发^[12]。

与健康烟田相比,青枯病发病土壤中放线菌门、变形菌门、疣微菌门和酸杆菌门等微生物的比例显著降低,而厚壁菌门、拟杆菌门和浮霉菌门等微生物的相对丰度大幅升高^[30]。本研究也发现了相似的结果,复合菌剂的使用能够增加根围土中微生物群落的多样性,降低有害微生物的丰度,进而抑制病害发生,但不同的是复合菌剂处理后酸杆菌门和疣微菌门的相对丰度比 CK 组低,其原因可能是不同的生防菌剂和不同的土壤、气候环境使得根围土细菌群落对不同处理的响应不一样。在番茄中也有类似的报道,复合菌剂(WL-4+CW-02)处理也能显著消减青枯病根围土的优势群落酸杆菌门的丰度^[32]。

一般认为健康烟田中有益微生物的种类和丰度较高而使得青枯病的发生率较低^[33],比如芽孢杆菌、假单胞菌和放线菌等有益菌是抑制青枯病的关键微生物^[34]。本研究用复合菌剂处理连作 15 年的烟田后,根围土壤的细菌群落结构在属水平上发生了较大的变化,既增加了黄杆菌属、链霉属和类芽孢杆菌属等具有抑制病原菌、降解病原菌分泌的毒素和促进植物生长功能的有益菌^[35-36],又降低了劳尔氏菌属、梭菌属和魏斯氏菌属等加剧青枯病发生的有害微生物^[37-38],通过调节连作烟田有益菌和有害菌的种类和丰度间接达到防治青枯病的目的。

长期连作会改变土壤微生物群落结构并抑制根围微生物组功能,导致根围微生态失衡,是引发青枯病的关键原因,因此保持根围微生态的平衡是防治烟草青枯病重要的基础与保障^[30]。土壤理化性质是构成根围微生态的重要因素,与植物和根围微生物区系的健康息息相关;土壤理化性质的变化在一定程度上影响了根围微生物的结构组成,反过来根围微生物群落的变化也会影响土壤的理化性质^[39]。本研究仅分析了复合菌剂处理后根围土壤细菌层面上的变化,还需要

对土壤理化性质的变化、真菌群落以及土壤动物的变化进行分析,进而全面地阐明复合菌剂通过调节根围微生态来防治青枯病的机制,为青枯病的防治及生防菌剂的开发提供理论指导。另外,本研究对复合菌剂降解化感物质的机制方面未进行细致而深入的研究,接下来我们将挖掘关键的降解酶,构建多降解酶融于一体的工程菌,同时与解磷菌、解钾菌、产铁载体菌、土壤改良剂以及植物源农药等进行复配,期望开发出防效更好、功能更多、适应性更广的复合生防菌剂。

综上所述,本研究将 4 株化感自毒物质降解菌按照生物量 1:3:4:2 的比例进行复配并制成可湿性粉剂,其 100 倍稀释液在大田试验中具有明显的抗病促生效果,具有进一步开发推广的价值。

参考文献

- [1] ALARIQI M, WEI H, CHENG JQ, SUN YW, ZHU HY, WEN TW, LI YP, WU CL, JIN SX, CAO JL. Large-scale comparative transcriptome analysis of *Nicotiana tabacum* response to *Ralstonia solanacearum* infection[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2022, 16(6): 757-775.
- [2] SEO S, GOMI K, KAKU H, ABE H, SETO H, NAKATSU S, NEYA M, KOBAYASHI M, NAKAHO K, ICHINOSE Y, MITSUHARA I, OHASHI Y. Identification of natural diterpenes that inhibit bacterial wilt disease in tobacco, tomato and *Arabidopsis*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(8): 1432-1444.
- [3] 李石力. 有机酸类根系分泌物影响烟草青枯病发生的机制研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017.
LI SL. The mechanism research of tobacco bacterial wilt influenced by organic acid from root exudates[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [4] CHEN D, ZHOU YJ, WANG M, MUJTABA MUNIR MA, LIAN JP, YU S, DAI K, YANG XE. Succession pattern in soil micro-ecology under tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) continuous cropping circumstances in

- Yunnan Province of southwest China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 785110.
- [5] 李碧德. 两种生防菌(*Paenibacillus polymyxa* 与 *Pseudomonas fluorescens*)防控烟草青枯病的特性研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2018.
LI BD. Study on the characteristics of two biocontrol bacteria (*Paenibacillus polymyxa* and *Pseudomonas fluorescens*) in controlling tobacco bacterial wilt[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2018 (in Chinese).
- [6] 朱冉志. 宜宾烟区青枯病发生流行规律及综合防治技术研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2020.
ZHU RZ. Study on the epidemic pattern and integrated control technology of tobacco *Ralstonia* in Yibin[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [7] 章文水, 张瀛, 王雪仁, 林建麒. 不同土壤改良措施对植烟土壤理化性状及烟草青枯病的影响[J]. *中国烟草科学*, 2019, 40(2): 16-22.
ZHANG WS, ZHANG Y, WANG XR, LIN JQ. Effects of different soil improvement measures on physicochemical properties of soil and bacterial wilt of tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2019, 40(2): 16-22 (in Chinese).
- [8] 孙成成. 多粘类芽孢杆菌在烟株内定殖特性及对烟草青枯病的防效研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2021.
SUN CC. Study on colonization characteristics of *Paenibacillus polymyxa* in tobacco plants and its control effect on tobacco bacterial wilt[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2021 (in Chinese).
- [9] 刘晓姣. 烟草根际抑病土壤有益微生物的组学特征及对青枯病的拮抗作用研究[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2018.
LIU XJ. Characteristics of tobacco rhizospheric beneficial microbiome in the soil suppressive to bacterial wilt disease[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Southwest University, 2018 (in Chinese).
- [10] WANG Y, ZHANG W, ZHANG Z, WANG W, XU S, HE X. Isolation, identification and characterization of phenolic acid-degrading bacteria from soil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(1): 208-220.
- [11] WU K, YUAN SF, XUN GH, SHI W, PAN B, GUAN HL, SHEN B, SHEN QR. Root exudates from two tobacco cultivars affect colonization of *Ralstonia solanacearum* and the disease index[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 141(4): 667-677.
- [12] LI SL, XU C, WANG J, GUO B, YANG L, CHEN JN, DING W. Cinnamic, myristic and fumaric acids in tobacco root exudates induce the infection of plants by *Ralstonia solanacearum*[J]. *Plant and Soil*, 2017, 412(1): 381-395.
- [13] LIU YX, LI X, CAI K, CAI LT, LU N, SHI JX. Identification of benzoic acid and 3-phenylpropanoic acid in tobacco root exudates and their role in the growth of rhizosphere microorganisms[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 93: 78-87.
- [14] MONISHA TR, ISMAILSAB M, MASARBO R, NAYAK AS, KAREGOUDAR TB. Degradation of cinnamic acid by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas* sp. TRMK2[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(8): 368.
- [15] PLAGGENBORG R, OVERHAGE J, STEINBÜCHEL A, PRIEFERT H. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(5): 528-535.
- [16] LU P, HUANG HY, SUN YX, QIANG MY, ZHU Y, CAO MJ, PENG X, YUAN B, FENG ZZ. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Acinetobacter johnsonii* FZ-5 and *Klebsiella oxytoca* FZ-8 under anaerobic conditions[J]. *Biodegradation*, 2022, 33(1): 17-31.
- [17] CHANG XH, WANG Y, SUN JG, XIANG HB, YANG Y, CHEN SW, YU J, YANG CL. Mitigation of tobacco bacteria wilt with microbial degradation of phenolic allelochemicals[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 20716.
- [18] LI XG, DING CF, HUA K, ZHANG TL, ZHANG YN, ZHAO L, YANG YR, LIU JG, WANG XX. Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 78: 149-159.
- [19] DENG JJ, ZHANG YL, HU JW, JIAO JG, HU F, LI HX, ZHANG SX. Autotoxicity of phthalate esters in tobacco root exudates: effects on seed germination and

- seedling growth[J]. *Pedosphere*, 2017, 27(6): 1073-1082.
- [20] DUAN YN, CHEN R, ZHANG R, JIANG WT, CHEN XS, YIN CM, MAO ZQ. Isolation, identification, and antibacterial mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* QSB-6 and its effect on plant roots[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 746799.
- [21] WINKELMANN T, SMALLA K, AMELUNG W, BAAB G, GRUNEWALDT-STÖCKER G, KANFRA X, MEYHÖFER R, REIM S, SCHMITZ M, VETTERLEIN D, WREDE A, ZÜHLKE S, GRUNEWALDT J, WEIß S, SCHLOTTER M. Apple replant disease: causes and mitigation strategies[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2019, 30: 89-106.
- [22] FENG ZQ, WANG YY, MA LB, HUANG SZ, WANG LM, HE JG, GUO CJ. Genomic characteristics and functional analysis of *Brucella* sp. strain WY7 isolated from Antarctic krill[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(9): 2281.
- [23] 刘常利. 柑橘黑点病生防菌筛选、鉴定和制剂开发[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021.
LIU CL. Biocontrol fungi screening, identification & formulation development for *Citrus melanose*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2021 (in Chinese).
- [24] 姚晓东. 枯草芽孢杆菌 D-29 可湿性粉剂的研制及其生防效果的研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2016.
YAO XD. Preparation for wettable powder of *Bacillus subtilis* D-29 and its application as biocontrol agent[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [25] 李舒雯. 内生短芽孢杆菌 011 菌株培养优化及可湿性粉剂的研制[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2014.
LI SW. Studies on medium optimization and wetting powder of endophytic *Breviacillus subtilis* strain 011[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [26] 郭庄园, 杨成德, 金梦军, 崔凌霄, 蔡锋锋, 敖远, 魏立娟. 枯草芽孢杆菌 262XY2'可湿性粉剂的研制[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(2): 414-420.
GUO ZY, YANG CD, JIN MJ, CUI LX, CAI FF, AO Y, WEI LJ. Development of wettable powder formulation of *Bacillus subtilis* 262XY2'[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(2): 414-420 (in Chinese).
- [27] 皮静. 肉桂酸影响烟草青枯病发生的机制研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2023.
PI J. Study on the mechanism of cinnamic acid affecting the occurrence of tobacco bacterial wilt[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2023 (in Chinese).
- [28] HU Y, ZHAO W, LI XH, FENG J, LI CL, YANG XQ, GUO QQ, WANG L, CHEN SW, LI YY, YANG Y. Integrated biocontrol of tobacco bacterial wilt by antagonistic bacteria and marigold[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 16360.
- [29] 赵思崎, 王敬敬, 杨宗政, 李晴晴, 杨榕, 赵维, 徐松, 朱丹, 黄志勇. 微生物复合菌剂的制备[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1492-1502.
ZHAO SQ, WANG JJ, YANG ZZ, LI QQ, YANG R, ZHAO W, XU S, ZHU D, HUANG ZY. Preparation of microbial compound agents[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1492-1502 (in Chinese).
- [30] 李俊领, 马晓寒, 张豫丹, 贾玮, 许自成. 土壤微生物与烟草青枯病发生关系的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(9): 88-99.
LI JL, MA XH, ZHANG YD, JIA W, XU ZC. Research progress on the relationship between soil microorganism and tobacco bacterial wilt[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(9): 88-99 (in Chinese).
- [31] 赵丹丹. 不同浓度微生物菌剂对番茄土壤理化性质及生长的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.
ZHAO DD. Effects of different concentrations of microbial agents on soil physical and chemical properties and growth of tomato[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2020 (in Chinese).
- [32] 王文丽, 金涵, 从炳成, 周蕾, 韦中, 王世梅. 复合微生物菌剂对番茄青枯病的生防效应[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(6): 1174-1182.
WANG WL, JIN H, CONG BC, ZHOU L, WEI Z, WANG SM. Biocontrol effect of composite microbial agent on tomato bacterial wilt[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(6): 1174-1182 (in Chinese).
- [33] WEI Z, YANG TJ, FRIMAN VP, XU YC, SHEN QR, JOUSSET A. Trophic network architecture of

- root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8413.
- [34] LI M, WEI Z, WANG JN, JOUSSET A, FRIMAN VP, XU YC, SHEN QR, POMMIER T. Facilitation promotes invasions in plant-associated microbial communities[J]. *Ecology Letters*, 2019, 22(1): 149-158.
- [35] DENG SW, WIPF HML, PIERROZ G, RAAB TK, KHANNA R, COLEMAN-DERR D. A plant growth-promoting microbial soil amendment dynamically alters the strawberry root bacterial microbiome[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 17677.
- [36] 施河丽, 向必坤, 左梅, 彭五星, 尹忠春, 王瑞, 谭军. 黄腐酸与微生物菌剂协同对烟草青枯病及根际土壤细菌群落的影响[J]. *烟草科技*, 2021, 54(9): 1-10.
- SHI HL, XIANG BK, ZUO M, PENG WX, YIN ZC, WANG R, TAN J. Synergistic effects of fulvic acid and microbial agents on tobacco bacterial wilt and bacterial community in rhizosphere soil[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2021, 54(9): 1-10 (in Chinese).
- [37] 吴文祥. 烟草自毒物质及其对根际土壤微生物影响的研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2010.
- WU WX. Studies on the autotoxic substances of tobacco and the effects of autotoxic substances on the rhizospheric microbiology[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2010 (in Chinese).
- [38] HU QL, TAN L, GU SS, XIAO YS, XIONG XY, ZENG WA, FENG K, WEI Z, DENG Y. Network analysis infers the wilt pathogen invasion associated with non-detrimental bacteria[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2020, 6: 8.
- [39] LI JX, ZHANG Q, LI M, YANG XJ, DING J, HUANG JH, YAO PW, ZHANG XQ, LI XL, YANG L. Multi-factor correlation analysis of the effect of root-promoting practices on tobacco rhizosphere microecology in growth stages[J]. *Microbiological Research*, 2023, 270: 127349.